



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>4</sup> :</b>  <b>A61K 39/395</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 88/ 09671</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 15 décembre 1988 (15.12.88)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR88/00287 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 6 juin 1988 (06.06.88) <b>(31) Numéro de la demande prioritaire:</b> 87/08320 <b>(32) Date de priorité:</b> 12 juin 1987 (12.06.87) <b>(33) Pays de priorité:</b> FR <b>(71) Déposants (JP seulement):</b> IMMUNOTECH [FR/FR]; 70, route Léon-Lachamp, Laboratoires de Luminy, Case 915, F-13288 Marseille Cédex 9 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75645 Paris Cédex 13 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> SOULILLOU, Jean-Paul [FR/FR]; 32 ter, rue de l'Abbaye, F-44100 Nantes (FR). PEYRONNET, Pierre [FR/FR]; 53, avenue Rudioux, F-87000 Limoges (FR). LE MAUFF, Brigitte [FR/FR];		3, impasse Baudelaire, F-44240 La Chapelle-sur-Erdre (FR). HOURMANT, Maryvonne [FR/FR]; 34, rue Émile-Reder, F-44400 Rezé (FR). OLIVE, Daniel [FR/FR]; 56, avenue Massenet, F-13009 Marseille (FR). MAWAS, Claude [FR/FR]; 8, rue des Cinq-Cents, F-13007 Marseille (FR). DELAAGE, Michel [FR/FR]; 16, rue Adolphe-Thiers, F-13001 Marseille (FR). HIRN, Michel [FR/FR]; Villa Gyptis, 359, Corniche Kennedy, F-13008 Marseille (FR). JACQUES, Yannick [FR/FR]; 32 bis, rue Noire, F-44000 Nantes (FR). <b>(74) Mandataire:</b> RINUY, SANTARELLI; 14, avenue de la Grande-Armée, F-75017 Paris (FR). <b>(81) Etats désignés:</b> JP, US.  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> ACTIVE AGENT AND DRUG CONTAINING IT FOR PREVENTING OR COMBATING REJECTION OF A TRANSPLANTED ORGAN IN HUMANS  <b>(54) Titre:</b> AGENT ACTIF ET MÉDICAMENT EN CONTENANT DESTINÉ À PRÉVENIR OU À COMBATTRE LE REJET DE GREFFE D'ORGANE CHEZ L'HOMME  <b>(57) Abstract</b>  The drug is characterized in that it contains a monoclonal antibody capable of attaching itself to the human interleukin 2 receptor carried by the lymphocytes and in that it is not cytotoxic in vitro, even in the presence of a complement, while inhibiting cellular proliferation induced by interleukin 2, in particular the 33B3.1 antibody.  <b>(57) Abrégé</b>  Ce médicament est caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps monoclonal capable de se fixer au récepteur de l'interleukine 2 humaine porté par les lymphocytes et ayant la propriété de ne pas être cytotoxique in vitro, même en présence de complément, tout en inhibant la prolifération cellulaire induite par l'interleukine 2, en particulier l'anticorps 33B3.1.		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

AGENT ACTIF ET MEDICAMENT EN CONTENANT DESTINES A PREVENIR OU A COMBATTRE  
LE REJET DE GREFFE D'ORGANE CHEZ L'HOMME

La présente invention concerne un agent actif destiné à  
5 prévenir ou à combattre le rejet de greffe d'organe chez l'homme ainsi  
qu'un médicament contenant un tel agent.

A l'heure actuelle, les greffes d'organes humains se  
développant de plus en plus, le besoin de disposer de moyens efficaces  
et fiables pour prévenir ou combattre le rejet de ces greffes d'organes  
10 prend une importance considérable pour favoriser la poursuite des  
travaux et des recherches dans le domaine chirurgical.

La présente invention fournit un tel moyen. Ce dernier est  
essentiellement constitué d'un anticorps monoclonal dirigé contre les  
récepteurs de l'interleukine 2 (IL2) humaine portés par les lymphocytes  
15 T activés, cet anticorps ayant en outre la propriété de ne pas être  
cytotoxique in vitro tout en inhibant la prolifération cellulaire induite  
par l'interleukine 2.

On sait que l'interleukine 2 est un facteur de croissance  
nécessaire pour le développement in vitro des clones de lymphocytes T  
20 (cf. MORGAN D.A., RUSCETTI F.W., GALLO R., Selective in vitro growth  
of T lymphocyte from normal human bone marrow . Science 1976 ; 193 :  
1007-11 (1) ), qui agit par interaction avec un récepteur spécifique  
à forte affinité (cf. ROBB R.J., MUNCK A., SMITH K.A., T-cell growth  
factor receptors. Quantitation specificity and biological relevance.  
25 J. Exp. Med. 1981, 154 ; 1455-67 (2) ). L'expression du récepteur de  
l'IL2 (R-IL2) à la surface de la membrane du lymphocyte T est sous  
le contrôle de l'activation antigénique et est soumis à une régulation  
supplémentaire par l'IL2 elle-même (cf. JACQUES Y., LE MAUFF B., GODARD A.,  
OLIVE D., MOREAU J.F., SOULILLOU J.P., Regulation of Interleukine 2  
30 receptor expression on a human cytotoxic T lymphocyte clone, synergism  
between alloantigenic stimulation and IL2., J. Immunol. 1986 ; 136 :  
1693 - 99 (3) ).

Le R-IL2 se révèle être un complexe formé d'une chaîne (55 Kd) (antigène Tac) et d'une chaîne  $\beta$  récemment décrite (75 Kd), les deux chaînes étant nécessaires pour l'expression du site à forte affinité (cf. SHARON M.; KLAUSNER R.P., CULLEN B.R., CHIZZONITE R.,  
5 LEONARD W.J., Novel Interleukin-2, Receptor subunit detected by cross-linking under high affinity conditions, Science 1986 ; 134 ; 859-63 (4)).

On sait aussi que des anticorps monoclonaux spécifiques des R-IL2 de rongeurs et capables de supprimer la prolifération in vitro des lymphocytes T activés, induite par l'IL2, se sont révélés empêcher  
10 ou inverser le processus de rejet aigu d'une allogreffe cardiaque chez la souris (cf. KIRKMAN R.L., BARRET L.V., GAULTON G.N., KELLEY V., YIHIER A., STROM T.B., Administration of an anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody prolongs cardiac allograft survival in mice, J. Exp. Med., 1985 ; 162 : 358-62 (5)), et retarder le rejet de peau chez la  
15 souris (cf. GRANDSTEIN R.D., GOULSTON C., GAULTON G.N., Prolongation of murine skin allograft survival by immunologic manipulation with anti-interleukin 2 receptor antibody, J. Immunol. 1986, 136 : 898-902 (6)) ou le rejet de rein chez le singe (cf. SHAPIRO M.E., KIRKMAN R.L., REED M.H., PUSKAS J.P., MAZOUJIAN G., LEIVIN N.L., CARPENTER C.B., MILFORD  
20 E.L., WALDMAN T.A., STROM T.B., SCHLOSSMAN S.F., Monoclonal anti-IL2 receptor antibody in primate renal transplantation, Transpl. Proc. 1987 : 594-98 (7)). De même, chez l'homme, plusieurs anti-R-IL2 ont été obtenus à partir de la souris (cf. UCHIYAMA T., BRODER S., WALDMAN T.A., A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and  
25 functionally mature human T cells, J. Immunol. 1981 ; 126 : 1383-97 (8)) et du rat (cf. OLIVE D., RAYMOND J., DUBREUIL P., CHARMOT D., JACQUES Y., MAWAS C., Anti Interleukin 2 receptor monoclonal antibody-receptor interactions in their antagonistic effects on interleukin-2-dependent T-cell growth, Eur. J. Immunol. 1986 ; 16 : 611-20 (9)),  
30 tous reconnaissant le constituant 55 Kd du R-IL2. Des travaux récents ont montré que les répertoires immunologiques du rat et de la souris distinguent deux épitopes principaux sur le R-IL2 humain. Un de ceux-ci, étroitement apparenté au site d'interaction avec l'IL2, provoque un blocage fonctionnel ; l'autre est indépendant du site de liaison  
35 à l'IL2 et il est incapable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T activés induite par l'IL2.

Or, les Demandeurs ont constaté de façon inattendue que des anticorps ayant justement la propriété de ne pas être cytotoxiques, même en présence de complément, tout en inhibant la prolifération des cellules induite par l'interleukine 2 étaient bien tolérés par des patients ayant subi la greffe d'un organe et que ces anticorps étaient efficaces pour empêcher le rejet de cet organe greffé et pouvaient donc entrer dans la composition de médicaments. On citera en particulier comme anticorps selon l'invention, un anticorps monoclonal de souris de classe IgG1 ; un anticorps monoclonal de rat de classe IgG2a ; un anticorps monoclonal humain ; un anticorps monoclonal chimère comportant une partie d'origine humaine et une partie d'origine animale ; un anticorps d'origine humaine ou animale modifié chimiquement (par exemple au moyen de polyéthylèneglycol) pour supprimer les effets cytotoxiques en présence de complément.

D'autres caractéristiques et les avantages de l'invention ressortiront plus clairement de la description qui va suivre, faite en prenant comme exemple d'anticorps selon l'invention, l'anticorps connu sous l'appellation 33B3.1 qui est un anticorps monoclonal (AcMo) du type IgG2a provenant du rat.

Cet anticorps est produit à partir de liquide d'ascite de souris "nude" auxquelles on a injecté les cellules de l'hybridome 33B3.1. Les cellules et l'anticorps purifié ont été vérifiés pour l'absence de virus murins et de mycoplasmes. Pour les expérimentations et les essais qui seront relatés ci-après, l'anticorps en question se présentait en flacons de 5 ml contenant 5 mg de 33B3.1 dans 1 ml de sérum physiologique tamponné par un phosphate. Ces flacons étaient maintenus à 4°C jusqu'à leur utilisation. Le but de ces expérimentations et de ces essais était de montrer l'effet immunosuppresseur du 33B3.1 administré à titre de traitement préventif du rejet en transplantation rénale.

#### Exemple d'expérimentation

##### 1) Protocole :

L'AcMo 33B3.1 a été administré quotidiennement pendant 14 jours, en plus de 1 mg/kg de prednisone (CS) au jour 0, dose diminuée de 10 mg/semaine et avec 2 mg/kg d'azathioprine (AZA).

L'AcMo, dilué dans 100 ml de sérum physiologique, a été injecté quoti-  
diennement par voie intraveineuse (veine périphérique, injection  
intraveineuse lente pendant 10 minutes). L'administration de cyclosporine  
A (CyA) a commencé (6 mg/kg) à la fin du traitement par le 33B3.1. Des  
5 GAT (Thymoglobuline, Institut Mérieux, Lyon, France) ont été administrées  
à titre de traitement de secours de sept jours. Ainsi, dans le cas  
du rejet prouvé par biopsie au cours d'un traitement par l'AcMo, l'admi-  
nistration de 33B3.1 a été interrompue et l'administration de GAT  
a commencé à 2 mg/kg/jour et a été ensuite adaptée au maintien d'une  
10 teneur en lymphocytes T11<sup>+</sup> circulants inférieure à 10 %.  
Par ailleurs, des biopsies percutanées de rein ont été effectuées  
systématiquement au jour 9. Une fois l'administration de CyA commencée,  
les administrations de CS et d'AZA ont été progressivement diminuées  
et finalement supprimées en trois semaines. Chez les patients sous CyA,  
15 les épisodes de rejets ont été traités par des injections intraveineuses  
lentes de méthylprednisolone pendant 5 jours (respectivement 5, 5, 4, 3  
et 2 mg/kg/jour), puis par une dose orale de 1,5 mg/kg/jour de stéroïdes,  
dose qui a été diminuée lentement jusqu'à l'arrêt.

## 2) Patients :

20 Ils étaient au nombre de vingt-sept, dont le consentement  
a été obtenu après les avoir pleinement informés. Tous étaient receveurs  
d'une greffe primaire provenant de cadavre et possédaient des alloanti-  
corps réagissant avec moins de 50 % d'un ensemble de lymphocytes. Tous  
25 les patients ont été préalablement soumis à une transfusion et les  
greffes familiales ont été exclues. Neuf sujets ont reçu 5 mg/jour de  
33B3.1 (groupe A) et 18 autres patients 10 mg/jour (groupe B). Les  
examens de contrôle ont duré du 35e au 345e jour. Ces deux groupes  
de receveurs ont été comparés à :

30 - Un groupe "témoin historique" de 30 receveurs (groupe C)  
ayant subi une greffe en 1981. Ces patients n'ont reçu qu'un CS  
(2 mg/kg/jour pendant deux semaines, dose abaissée lentement à  
15 mg/jour à la fin du deuxième mois) et de l'AZA (2 mg/kg et suivant  
leur formule leucocytaire - FL) ; et

35 - Un groupe de 55 receveurs (groupe D) ayant reçu un  
traitement similaire à celui du groupe A ou B, sauf que les GAT ont  
été administrées (fistule artério-veineuse brachiale ou cathéter

central) à la place de 33B3.1.

Les receveurs des groupes C et D ont été également soumis à des transplantations primaires à partir de cadavres, sans hyper-immunisation (le tableau I ci-après présente leurs caractéristiques cliniques et immunologiques générales).

**Tableau I : Caractéristiques cliniques et immunologiques  
des différents groupes receveurs**

	<u>GROUPE A</u>	<u>GROUPE B</u>	<u>GROUPE C</u>	<u>GROUPE D</u>
	33B3.1 5 mg/j + Cs + AZA (n=9)	33B3.1 10 mg/j + Cs + AZA (n=18)	Cs + AZA  (n=30)	GAT + Cs + AZA (n=55)
Age*	35 (11-53)	37 (23-61)	30 (10-49)	35 (10-61)
Sex-ratio M/F	3,5	5	1,5	1,6
Nombre de transfusions*	5 (2-12)	5 (2->50)	5 (2-22)	6 (2-25)
PATIENTS avec 3 ou moins de 3 antigènes H L A A-B-DR mal appariés	22 %	66 %	73 %	58 %
Réactivité globale ***				
. Lymphocytes T	<20% n=8 >20% n=1	14 4	27 3	45 10
. Lymphocytes B	<20% n=7 >20% n=2	14 4	** **	34 21
Ischémie froide * durée (heures)	35 (18-48)	34,5 (21-48)	21,5 (9-29)	34,5 (6-50)
* Moyenne et valeurs extrêmes ** Résultats non disponibles *** Tous les patients présentaient une réactivité globale inférieure à 50 %				



3) Teneurs circulantes en 33B3.1 et contrôle de la réponse immunitaire anti-33B3.1 des receveurs :

Teneurs sanguines en 33B3.1 :

5 Les teneurs sanguines ont été mesurées par ELISA sur des sérums obtenus avant et après la greffe à intervalles réguliers. Les plaques d'ELISA ont été revêtues de Mark I, un Ac de souris anti-chaîne légère Kappa de rat, et la présence de 33B3.1 dans les sérums a été révélée avec de l'anti-Fab'<sub>2</sub> de rat (marqué à la  $\beta$ -galactosidase) provenant du mouton. Les concentrations sériques en 33B3.1  
10 ont été déterminées d'après une courbe d'étalonnage classique obtenue avec des dilutions successives de 33B3.1 pur.

Détection de l'anti - 33B3.1 :

15 La présence d'IgG ou D4 IgM anti-33B3.1 dans les sérums recueillis pendant et après le traitement à l'AcMo a été testée par ELISA. Des plaques ont été revêtues de 33B3.1 pur, mises à incuber avec des sérums dilués des receveurs et révélées avec une anti-IgM ou IgG humaine marquée avec une peroxydase provenant de la chèvre. La  
20 réaction a été considérée comme étant positive lorsque la valeur moyenne de la double détermination était supérieure de trois écarts-types à la valeur moyenne témoin.

Résultats

25 1) Tolérance au traitement :

Le 33B3.1 a été bien toléré. Seuls cinq patients sur vingt sept ont présenté des effets secondaires minimes : l'un, éruption cutanée, deux autres des douleurs veineuses locales, un autre un vertige et une réaction anaphylactoïde lors de la dernière injection intraveineuse  
30 lente d'AcMo. En aucun cas, ces effets secondaires n'ont conduit à l'interruption du traitement. Une fièvre d'intensité faible a été habituellement observée au cours des premières 48 heures. A l'opposé, une fièvre de forte intensité a été observée chez 52 % des patients du groupe D, et respectivement 18 et 25 % d'entre eux présentaient une  
35 éruption cutanée et une maladie sérique aiguë.

Aucune différence (ni diminution) des numérations d'hématies et de plaquettes n'a été notée entre les patients des groupes A, B et C suggérant que le 33B3.1 possède seulement une incidence faible sur ces paramètres. Le nombre de cellules polynucléaires a été multiplié par 1,7, à 2 au cours du traitement par l'AcMo. Une faible lymphopénie a été observée (diminution de 20 % des valeurs de départ, culminant au jour 6), qui contrastait néanmoins avec la chute brutale des comptages de lymphocytes ( $P < 0,01$  test t de Fisher) observée dans le groupe D. Les rapports  $T4^+ / T8^+$  n'ont pas été modifiés chez les patients des groupes A et B pendant tout le traitement par le 33B3.1. Deux patients du groupe A et quatre du groupe B ont présenté des épisodes d'infection virale (5 CMV et 1 EVB). Un patient du groupe A a présenté une candidose buccale étendue.

2) Incidence du rejet :

Jusqu'à présent, pour les groupes A et B réunis, tous les patients, sauf deux, possèdent un rein fonctionnel : un s'est suicidé (jour 32, histologie du rein normale) et un autre a présenté une rupture technique (élimination de la greffe par nécrose urétérale profonde, histologie du rein normale). Parmi les neuf patients du groupe A, trois ont présenté des symptômes de rejet pendant la période d'injection intraveineuse lente de 33B3.1 (tableau II ci-après).

Tableau II : Incidence d'un rejet aigu chez les divers groupes au cours du premier mois suivant la transplantation

	<u>GROUPE A</u>	<u>GROUPE B</u>	<u>GROUPE C</u>	<u>GROUPE D</u>
	33B3.1 5mg/j (n=9)	33B3.1 10 mg/j (n=18)	Témoin historique (n=30)	GAT (n=55)
Rejet au cours de la période de traitement par l'AcMo ou d'une période similaire (jours 0 à 13)	33,3 %	5,6 %*	66,6 %	4 %
Rejet au cours du premier mois	44,4 %	5,6 %**	76,6 %	15 %
<p>* <math>p &lt; 0.001</math>, comparativement au groupe C</p> <p>** un patient, présentant un échec technique, non pris en considération</p>				

Dans tous les cas, des biopsies rénales ont confirmé le diagnostic. Les épisodes de rejet étaient tous réversibles après un traitement de secours. Parmi les 18 patients du groupe B, un seul a présenté un épisode de rejet, réversible au moyen du traitement de secours. Néanmoins, des biopsies systématiques, effectuées au jour 9 (4 patients du groupe A et 5 du groupe B) ont montré un certain degré d'infiltration des lymphocytes en l'absence de symptômes cliniques de rejet, pouvant être compatible avec un "rejet histologique" faible. Bien que ces patients n'aient reçu aucun traitement de secours par GAT, leur fonction rénale est restée intacte et aucun rejet "clinique" ne s'est produit. A l'opposé, 66 % des patients du groupe témoin historique ont présenté un rejet aigu dans les deux premières semaines ( $P > 0,001$ , comparativement au groupe B, test  $X^2$ ). Quatre pour cent des receveurs sous GAT ont présenté un épisode de rejet au cours d'une période similaire. Réunis, ces résultats suggèrent un effet protecteur fort du 33B3.1 utilisé à 10 mg/jour, contre un rejet précoce.

En outre, deux patients (tous deux n'ayant présenté aucun rejet au cours du traitement par 33B3.1) ont présenté un épisode de rejet après la période d'injection intraveineuse lente d'AcMo : au jour 47 (groupe A) et au jour 35 (groupe B).

### 3) Teneurs sanguines en AcMo et réponse immunitaire anti-33B3.1 des receveurs

La figure annexée montre les teneurs sanguines (24 heures après injection intraveineuse lente) en 33B3.1 circulant. Dans le groupe A, un patient (n'ayant jamais présenté de rejet) possédait une teneur en 33B3.1 circulant indétectable et les autres (comprenant ceux présentant un rejet pendant le traitement par le 33B3.1) présentaient une teneur sanguine allant d'une valeur indétectable à 1,6  $\mu\text{g/ml}$ . Les receveurs du groupe B présentaient sans ambiguïté une teneur circulante supérieure (1,5 à 9  $\mu\text{g/ml}$ ), y compris les seuls receveurs de ce groupe ayant présenté un rejet. Cependant, un patient possédait encore une teneur basale faible (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ).

Le tableau III ci-après montre que, parmi les 27 patients, 23 ont produit des anticorps contre le 33B3.1, d'isotype IgM (20/27) et/ou IgG (21/27). Seize patients possédaient des anticorps anti-33B3.1

détectables au cours du traitement par l'AcMo, sans rejet. La réponse des IgM et IgG a atteint un pic environ 10 jours après la fin du traitement par le 33B3.1.

- 5 Quant à la figure annexée qui donne les teneurs sanguines en 33B3.1, mesurées au cours du traitement par l'AcMo, les diagrammes A et B correspondent respectivement aux valeurs obtenues dans les groupes A et B avec -O-désignant des patients ayant présenté des épisodes de rejet et -●- ceux n'ayant présenté aucun rejet.

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

Tableau III : Réponse anti-33B3.1 des patients des groupes A et B

		Réponse par IgM		Réponse par IgG	
		Nombre de patients positifs	Temps nécessaire (en jours) pour les teneurs maximales	Nombre de patients positifs	Temps nécessaire (en jours) pour les teneurs maximales
		Nombre de patients des IgM au cours du traitement par Acto		Nombre de patients des IgG au cours du traitement par Acto	
Groupe A n=9	6	23 ± 5	1	7	24 ± 8
Groupe B n=18	14	21 ± 4	10	14	24 ± 7
					5
					8

De l'exemple ci-dessus, il ressort qu'un AcMo IgG2a de rat dirigé contre le site de liaison de l'IL2 sur le R-IL2 humain était capable d'empêcher le rejet aigu précoce d'un greffon. Cet AcMo était très bien toléré ; seuls des effets secondaires rares et de faible importance ont été observés. Dans un premier groupe dans lequel l'AcMo a été administré à 5 mg/jour, trois receveurs sur neuf ont présenté un épisode de rejet (réversible avec un traitement de secours par GAT) lorsqu'ils étaient sous traitement par 33B3.1. Des considérations théoriques suggérant que cette première dose de 33B3.1 peut être trop faible pour présenter un effet optimal, on a commencé le traitement d'une seconde série à 10 mg/jour, conduisant à une protection efficace. Dans ce groupe, un seul patient sur 18, a présenté des symptômes de rejet cliniquement détectables au cours des deux premières semaines suivant la transplantation (période de traitement par l'AcMo), comparativement à l'incidence de 66 % d'épisodes de rejet notée pendant la même période chez le groupe "témoin historique" ( $P < 0,001$ ). Bien que des transplantations anciennes aient été effectuées chez les patients de ce dernier groupe, le plan de transfusion et la stratégie d'appariement étaient similaires. Evidemment, si la concordance des HLA était faible chez le petit groupe A, les groupes B, C ou D possédaient une concordance similaire. De plus, les patients du groupe témoin historique ont reçu une posologie initiale de stéroïdes double de celle des patients des groupes A et B, comme le montre le tableau II ; avec les précautions nécessaires dues à la taille limitée de l'échantillon, le pourcentage de rejet observé chez les patients recevant 10 mg/jour de 33B3.1 était sensiblement similaire à celui observé chez les patients du groupe D auxquels une GAT, thérapeutique anti-rejet bien établie et efficace, a été administrée à la place du 33B3.1. Deux patients ayant reçu l'AcMo ont présenté des épisodes de rejet au bout des deux premières semaines, ce qui suggère qu'aucune délétion de clones ( $R^+$ -IL2) n'a eu lieu chez les patients traités par le 33B3.1 et que les rejets en retour ont été rares. Aucun épisode infectieux grave ne s'est produit parmi les patients du groupe A ou B.

Ainsi, les patients sous 33B3.1 n'ont pas présenté la lymphopénie profonde observée chez les patients du groupe D. Les lymphocytes T11<sup>+</sup>, T4<sup>+</sup> et T8<sup>+</sup> ont diminué légèrement et harmonieusement (c'est-à-dire rapports T4/T8 similaires) au cours du traitement par l'AcMo, conformément au fait que les deux sous-ensembles expriment les R-IL2 au cours du rejet (cf. 7 ci-dessus) et que les lymphocytes activés restent en minorité parmi les leucocytes périphériques. Tous les comptages de globules blancs ont notablement augmenté, comparativement au groupe D. Toutes ces variations concernant les leucocytes traduisent probablement l'association de l'effet du CS et de l'absence de réaction croisée néfaste du 33B3.1.

Le contrôle des teneurs en 33B3.1 a révélé qu'un patient du groupe A ne possédait aucune teneur sanguine détectable (bien que ne présentant aucun rejet), tandis que tous les patients du groupe B possédaient une teneur sanguine élevée et vraisemblablement saturante en 33B3.1 (conformément à l'affinité de l'AcMo pour le R-IL2) pouvant expliquer l'incidence de rejet très faible observée dans le groupe B. La plupart des patients ont produit des anticorps contre le 33B3.1. De même, dans cette petite série, aucune corrélation n'a pu être trouvée entre la manifestation d'un rejet (groupe A ou B) et la détection d'anticorps IgG et/ou IgM anti-33B3.1. Des tentatives pour estimer la présence d'anticorps anti-idiotypes ont toujours échoué en raison de concentrations contaminantes détectables de R-IL2 solubles. Chez certains patients (tableau III), il a été observé de manière inattendue des anticorps anti-33B3.1 dès le dixième jour après transplantation, ce qui était plus précoce que ce qui a été observé chez des receveurs traités par l'OKT3 (cf. GOLDSTEIN G., FUCELLO A.J., NORMAN P.J., SHIELD C.F., COLVIN R.B., COSINI B., OKT3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to OKT3, Transplantation 1986 ; 42 : 507-10 (12) et cf. CHATENAUD L., BAUDRIHAYE M.F., CHKOFF N., KREIS H., GOLDSTEIN G., BACH J.F., The restriction of the human in vivo immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3, J. Immunol. 1986 ; 137 : 830-38 (13)).

FEUILLE DE REMPLACEMENT



Ce nouveau traitement, utilisant un AcMo dirigé contre un récepteur de facteur de croissance présent seulement sur les lymphocytes T activés, médicalement bien toléré et efficace dans la prévention d'un épisode de rejet précoce, présente ainsi un intérêt primordial dans la modulation de la réponse allogénique chez l'homme. Il est donc applicable à n'importe quel type de greffe, non seulement le rein, mais aussi le coeur, le foie, le poumon, l'intestin, la moelle osseuse, etc...

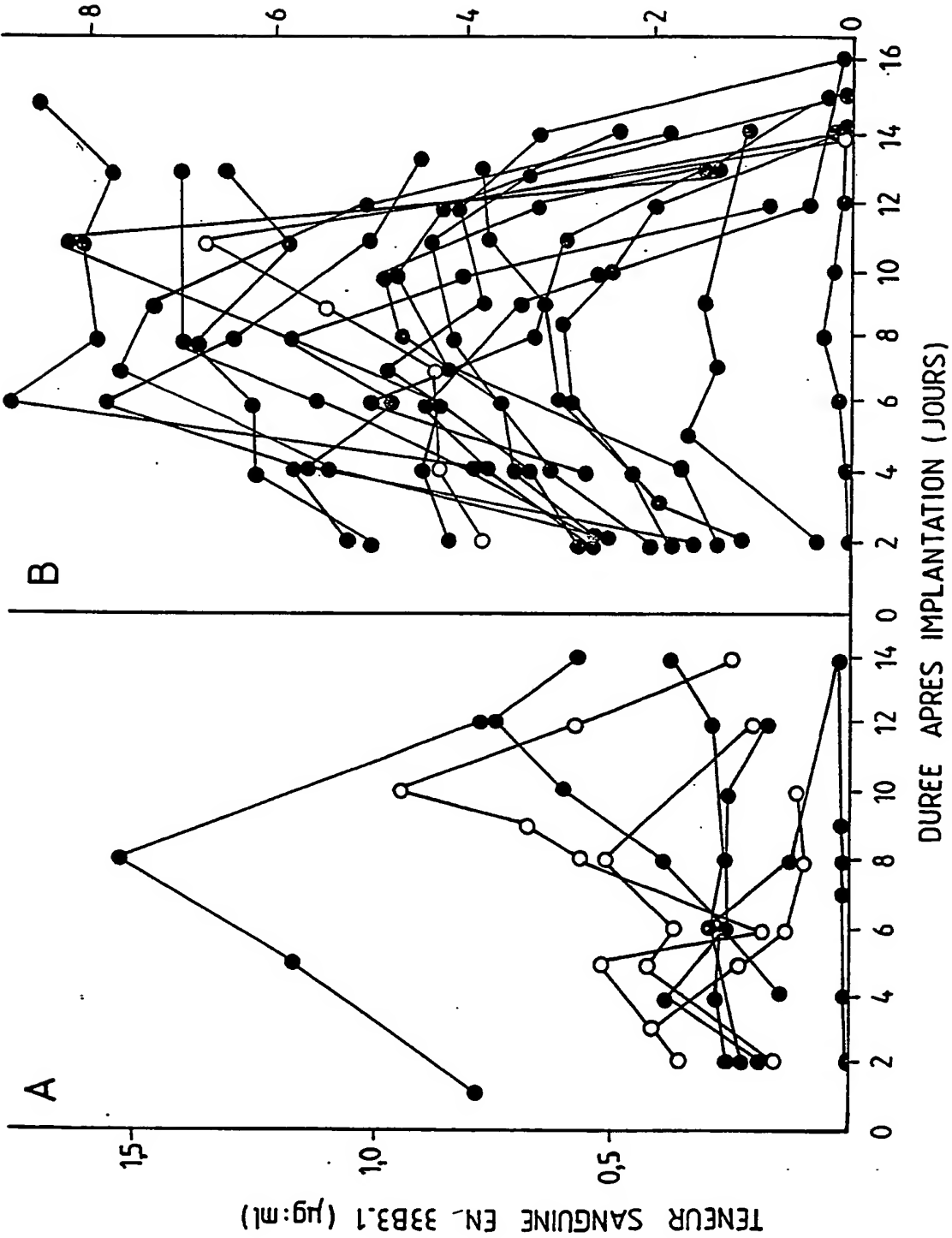
Du fait que l'anticorps agit par simple compétition avec l'interleukine 2, il est naturellement remplaçable par tout autre anticorps monoclonal de spécificité comparable de souris ou d'homme. Egalement, on doit considérer qu'un anticorps chimère combinant un site actif bloquant le récepteur de l'interleukine 2, apporté par un anticorps d'origine murine et une région constante d'origine humaine, sera également convenable.

L'important est de bloquer la fonction du récepteur sans tuer la cellule, ce qui évite tous les symptômes d'intoxication (le syndrome des brûlés) observés avec les anticorps cytotoxiques.

Enfin, il est possible d'utiliser un anticorps quelconque dont on aurait fait disparaître la cytotoxicité par greffage de groupements chimiques, et notamment de polyéthylèneglycol. Toutes ces substitutions qui respectent le concept d'anticorps bloquant les effets de l'interleukine 2 sans tuer les lymphocytes sont partie intégrante de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Agent actif destiné à prévenir ou à combattre le rejet de greffe d'organe chez l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps monoclonal capable de se fixer au récepteur de l'interleukine 2 humaine porté par les lymphocytes et ayant la propriété de ne pas être cytotoxique in vitro même en présence de complément, tout en inhibant la prolifération cellulaire induite par l'interleukine 2.
2. Agent actif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal de souris de classe IgG1.
3. Agent actif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal de rat de classe IgG2a.
4. Agent actif selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal de rat est l'anticorps 33B3.1.
5. Agent actif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal humain.
6. Agent actif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal chimère comportant une partie d'origine humaine et une partie d'origine animale.
7. Agent actif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal d'origine humaine ou animale modifié chimiquement pour supprimer les effets cytotoxiques en présence de complément.
8. Agent actif selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit anticorps d'origine humaine ou animale est chimiquement modifié au moyen de polyéthylèneglycol.
9. Médicament contenant au moins un agent actif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.
10. Médicament selon la revendication 9 contenant l'anticorps 33B3.1 .



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00287

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>4</sup> A61K 39/395		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>4</sup>	A61K;C12P	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> *		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Journal Experimental Medicine, vol. 162, July 1985, The Rockefeller University Press (US), R.L. Kirkman et al.: "Administration of an anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody prolongs cardiac allograft survival in mice", pages 358-362, see page 358, abstract; pages 360-361, "discussion" (cited in the application)	1-10
X	Transplantation Proceedings, vol. 19, Nr. 1, February 1987, M.E. Shapiro et al.: "Monoclonal anti-IL-2 receptor antibody in primate renal transplantation", pages 594-598, see page 594, abstract; pages 596-597, "discussion" (cited in the application)	1-10
X	The Journal of Immunology, vol. 136, Nr. 3, 1st February 1986, The American	1-10 ./.
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
30 August 1988 (30.08.88)		22 September 1988 (22.09.88)
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE		Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	Association of Immunologists (US), R.D. Granstein et al.: "Prolongation of murine skin allograft survival by immunologic manipulation with anti- interleukin 2 receptor antibody", pages 898-902, see page 898, abstract, pages 901-902, "discussion" (cited in the application) --	
X	Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 83, April 1986 (US), J.W. Kupiec-Weglinski et al.: "Therapy with monoclonal antibody to interleukin 2 receptor spares suppressor T cells and prevents or reverses acute allograft rejection in rats", pages 2624-2627, see page 2624, abstract; see pages 2626-2627, "discussion" --	1-10
A	The Journal of Immunology, vol. 136, Nr. 5, 1st March 1986, The American Association of Immunologists (US), Y, Jacques et al.: "Regulation of interleukin 2 receptor expression on a humancytotoxic T lymphocyte clone, synergism between alloantigenic stimulation and interleukin 2", see pages 1693-1699 (cited in the application) --	
A	Nature, vol. 300, Nr. 5889, 18 November 1982, (Chesham, Bucks, GB), W.J. Leonard et al.: "A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor", see pages 267-269 --	
Y, P	EP, A, 0235805 (THE ROYAL FREE HOSPITAL SCHOOL OF MEDICINE) 9 September 1987, see page 1, lines 6-9; page 2, lines 1-7; page 5, lines 25-34; page 6, lines 1-19 --	1-10

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y,P	EP, A, 0240344 (THE WELLCOME FOUNDATION LTD) 7 October 1987, see column 1, lines 43-48; column 4, lines 59-65; column 5, lines 1-25; column 8, example 5	1-10
	--	
X	EP, A, 0217992 (BETH ISRAEL HOSPITAL) 15 April 1987, see the whole document in particular page 3, lines 18-32	1-10
	-----	

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 8800287

SA 22774

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 16/09/88  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0235805	09-09-87	AU-A- 6969187 JP-A- 62281824	10-09-87 07-12-87
EP-A- 0240344	07-10-87	JP-A- 63002934	07-01-88
EP-A- 0217992	15-04-87	JP-A- 62056440	12-03-87

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00287

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB <sup>4</sup> :    A 61 K 39/395		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>4</sup>	A 61 K; C 12 P	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>6</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
X	Journal Experimental Medicine, vol. 162, juillet 1985, The Rockefeller University Press (US), R.L. Kirkman et al.: "Administration of an anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody prolongs cardiac allograft survival in mice", pages 358-362, voir page 358, résumé; pages 360-361, "discussion" cité dans la demande	1-10
X	Transplantation Proceedings, vol. 19, no. 1, février 1987, M.E. Shapiro et al.: "Monoclonal anti-IL-2 receptor antibody in primate renal transplantation", pages 594-598, voir page 594, résumé; pages 596-597, "discussion" cité dans la demande	1-10
X	The Journal of Immunology, vol. 136, no. 3, 1er février 1986, The American ./. 	1-10
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>•</sup> Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« A » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
30 août 1988	22 SEP 1988	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé P.C.G. VAN DER PUTTEN	



III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	Association of Immunologists (US), R.D. Granstein et al.: "Prolongation of murine skin allograft survival by immunologic manipulation with anti- interleukin 2 receptor antibody", pages 898-902, voir page 898, résumé; pages 901-902, "discussion" cité dans la demande	
X	-- Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 83, avril 1986 (US), J.W. Kupiec-Weglinski et al.: "Therapy with monoclonal antibody to interleukin 2 receptor spares suppres- sor T cells and prevents or reverses acute allograft rejection in rats", pages 2624-2627, voir page 2624, résumé; voir pages 2626-2627, "discussion"	1-10
A	-- The Journal of Immunology, vol. 136, no. 5, 1er mars 1986, The American Association of Immunologists (US), Y. Jacques et al.: "Regulation of interleukin 2 receptor expression on a human cytotoxic T lymphocyte clone, synergism between alloantigenic stimulation and interleukin 2", voir pages 1693-1699 cité dans la demande	
A	-- Nature, vol. 300, no. 5889, 18 novembre 1982 (Chesham, Bucks, GB), W.J. Leonard et al.: "A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor", voir pages 267-269	
Y,P	-- EP, A, 0235805 (THE ROYAL FREE HOSPITAL SCHOOL OF MEDICINE) 9 septembre 1987, voir page 1, lignes 6-9; page 2, lignes 1-7; page 5, lignes 25-34; page 6, lignes 1-19	1-10
Y,P	-- EP, A, 0240344 (THE WELLCOME FOUNDATION LTD) 7 octobre 1987, voir colonne 1, lignes 43-48; colonne 4, lignes 59-65; colonne 5, lignes 1-25; colonne 8, exemple 5	1-10
	-- ./.	

Demande internationale N° PCT/FR 88/00287

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
X	EP, A, 0217992 (BETH ISRAEL HOSPITAL) 15 avril 1987, voir le document en entier, notamment page 3, lignes 18-32 -----	1-10

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 8800287  
SA 22774

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 16/09/88  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0235805	09-09-87	AU-A- 6969187 JP-A- 62281824	10-09-87 07-12-87
EP-A- 0240344	07-10-87	JP-A- 63002934	07-01-88
EP-A- 0217992	15-04-87	JP-A- 62056440	12-03-87

EPO FORM P0472